

IAPI6 Rec'd PCT/PTO 20 SEP 2006
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

10/593694



CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 10 2004 013 762.5

Anmeldetag: 20. März 2004

Anmelder/Inhaber: Forschungszentrum Karlsruhe GmbH,
76133 Karlsruhe/DE

Bezeichnung: Verfahren zur besseren und schonenden Freiset-
zung wertgebender Inhaltsstoffe aus Weinbeeren, ein
daraus gewonnener Most sowie daraus erzeugter
Wein und eine Einrichtung zur Durchführung der
Elektroporation

IPC: C 12 G 1/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. April 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurks

A 9161
03/00
EDV-L

BEST AVAILABLE COPY

Forschungszentrum
Karlsruhe GmbH
ANR 5661498

Karlsruhe, den 19. März 2004
PLA 0413 WM/KB

**Verfahren zur besseren und schonenden Freisetzung
wertgebender Inhaltsstoffe aus Weinbeeren, ein
daraus gewonnener Most sowie daraus erzeugter
Wein und eine Einrichtung zur Durchführung
der Elektroporation**

Beschreibung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur besseren und schonenden Freisetzung wertgebender Inhaltsstoffe aus Weinbeeren, ein mit dem Verfahren prozessierter Most und den daraus erzeugten Wein sowie eine Einrichtung zur Durchführung des Verfahrens der Elektroporation.

Unter Elektroporation wird die Zellöffnung mittels eines elektrischen Feldes, d.h. die porenförmige Öffnung der Zellwand einer biologischen Zelle verstanden. Diese porenförmige Öffnung einer Zellwand ist bei Einwirkung eines schwächeren elektrischen Feldes reversibel, d.h. eine solche Pore verschließt sich nach der Einwirkung wieder, bei stärkeren elektrischen Feldern ist sie irreversibel, d.h. eine solche Pore bleibt auch nach der Einwirkung geöffnet/aufgerissen. Das Verfahren der Elektroporation wurde erstmalig im Jahr 1960 in der Patentschrift DP 123 741 vorgestellt. Die Elektroporation alleine ist eine nicht-thermische Öffnung der Zellwände. Mit ihr wird die schonende Freisetzung der wertgebenden Zellinhaltsstoffe erreicht.

Für die Lebensmittelindustrie ist die Elektroporation zum Aufschluss von biologischen Zellen von Interesse. Einerseits wegen des schonenden Aufschlusses der Zellen und andererseits ist die Elektroporation ein energiesparender Verfahrensschritt. In den herkömmlichen Aufschluss-/Erschließungsverfahren wird das pflanzliche Prozessgut unter Aufwendung thermischer und damit teurer Energie erwärmt, wodurch die Zellwände bei hinreichender thermischer Einwirkung permeabel werden, aber dabei auch manche ernährungsphysiologisch bedeutsamen Inhaltsstoffe thermisch geschädigt/zersetzt und/oder unerwünschte Inhaltsstoffe mobilisiert werden.

In anderen herkömmlichen Verfahren wird das pflanzliche Pro-

zessgut mechanisch zu Brei zerrieben, das aber das anschließende Abpressen schwierig gestaltet und zu einem Presskuchen mit geringem Festanteil führt, bzw. einen hohen Verlust an Fruchtsaft/Most etc. mit sich bringt.

Zunehmend kommen auch Enzyme zum Einsatz, die die Zellmembranen öffnen, jedoch den Nachteil haben, dass sie nur eingeschränkt zugelassen und kostspielig sind, der Fruchtsaft/Most etc. geschmacklich verändert wird und z.B. daraus hergestellter Fruchtsaft oder Wein mangel- oder fehlerhaft ist.

In vielen Bereichen werden Inhaltsstoffe mit Äthylalkohol erschlossen. Der Alkohol löst die aus Fettmolekülen bestehenden Zellwände auf und setzt so die wertgebenden Inhaltsstoffe frei.

Alle Erschließungs-/Aufschlussverfahren von biologischen Zellen werden primär an der Unbedenklichkeit der damit gewonnenen Produkte und wirtschaftlich an den Kosten für das Verfahren gemessen.

In der Saft-/Mostwirtschaft werden sehr ausgeklügelte Verfahren zum Erschließen der biologischen Zellsubstanzen angewendet. Das trifft insbesondere auf die Weinerzeugung zu, wo die Verfahren zur Weiß- und Rotweinerzeugung ganz erhebliche Eigenheiten haben. Der Ausbau zu Weinen ist abhängig von den Substanzen die in den Mosten sind, sie sind Basis für die bei Ausbau erreichte Qualität.

In der klassischen Weinbereitung werden die gelesenen Weintrauben zur Mostgewinnung entbeert, in der Fachsprache entrappt, und dann die Beeren eingemaischt. Abhängig von der geforderten Qualität des Weines schließt sich eine z. B. 10 Tage dauernde Maischegärung, oft in speziellen, auf bis zu 38°C erwärmten doppelwandigen Behältern an, in der die alkoho-

lische Gärung einsetzt. Der in der Konzentration zunehmende Alkoholgehalt wird für die Auflösung der Zellmembranen in der Beerenhaut benutzt. Es kommt so zum Auszug der Inhaltsstoffe aus den Zellen, wie Farb- und Gerbstoffe, Aromastoffe sowie andere wasser- und alkohollösliche Substanzen, auch pflanzenspezifische Eiweiße. Der Auszug der Gerbstoffe verläuft am langsamsten und ist in der Regel nach 10 Tagen noch nicht abgeschlossen.

Die Maischegärung wird vorrangig für die Herstellung von hochwertigen Rotweinen eingesetzt, da hierfür entsprechend hochwertiges Lesegut zur Verfügung steht. Allerdings sind dabei die Heiz- und Lagerkosten ein gewichtiger, nicht vernachlässigbarer Kostenfaktor. Bei minderer roter Traubenqualität oder zur Bereitung von Massenrotweinen kommt häufig die Maischeerhitzung etwa über Wärmetauscher zum Zuge. Die Maische wird damit für kurze Zeit, beispielsweise für 1 Minute auf 85 °C erhitzt. Pro Tonne Maische werden als Orientierung etwa 10 l Heizöl für die Dampferzeugung benötigt. Zwar erfolgt bei der Maischeerhitzung eine gute Farbstoffausbeute, wegen der wässrig-thermischen Extraktionsbedingungen werden jedoch insbesondere die Gerbstoffe weniger stark extrahiert. Damit werden eher glatte, früh trinkbare und wenig lagerfähige Weine ohne große Tiefe und Länge erzeugt. Das Auftreten eines Kocharomas ist gelegentlich zu beobachten.

Weißer Weinbeeren werden in der Regel unmittelbar nach dem Einmaischen gegebenenfalls nach kurzer Standzeit abgepresst, so dass die Inhaltsstoffe der Beerenhaut nicht in größerem Umfang in den Most gelangen, sondern im Trester verbleiben. Bei sogenannten Bukettsorten ist allerdings zur Extraktion der Aromen und deren Vorstufen ein vorheriger Aufschluss der Beerenhautzellen erforderlich. In der Regel wird dies durch längere Maischestandzeit erreicht, wobei traubeneigene Enzyme und/oder zugesetzte Enzym-Präparate den Aufschluss besorgen. Auch für

gerbstoffbetontere Weißweine sowie zur besseren Extraktion der zur Gärung erforderlichen Stickstoff-Substanzen usw. sind derartige längere Maischestandzeiten üblich. Risiken dabei sind das Wirken unerwünschter Enzyme/Eiweiße sowie die Entwicklung schädlicher Mikroorganismen und Hefen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur schnelleren, besseren und schonenden Freisetzung wertgebender Inhaltsstoffe aus Weinbeeren zu entwickeln, das sich in der Qualität des aus der Maische gewonnenen Mostes und in dem wiederum daraus ausgebauten Wein niederschlägt. Darüber hinaus soll eine Einrichtung vorgeschlagen werden, mit denen die irreversible Elektroporation an den Hautzellen der Weinbeeren wirksam und energiesparend durchgeführt werden kann.

Die Aufgabe wird durch die Verfahrensschritte des Anspruchs 1 gelöst. Ergebnis des Verfahrens ist nach Anspruch 6 der aus der zumindest teilweise elektroporierten Maische gewonnene Most/Saft und der daraus erzeugte Wein. Mit einer Einrichtung nach Anspruch 7 zur Erzeugung eines pulsartigen, elektrischen Feldes mit im Durchströmvolumen zumindest bereichsweise stark inhomogenem Feldverlauf, durch das die Maische zur irreversiblen Elektroporation hindurchgeströmt oder schubweise dort eingebracht wird, kann die Maische aus Weinbeeren prozessiert werden.

Das Verfahren zur besseren und schonenden Freisetzung der wertgebenden Inhaltsstoffe aus Weintrauben besteht aus folgenden Schritten:

Die aus roten und/oder weißen Weintrauben gewonnene Maische wird auf einer Temperatur gehalten oder auf eine Temperatur gebracht, die zumindest oberhalb der Gefriertemperatur der Maische liegt und bis zu bei der herkömmlichen Maischeerwärmung bekannten Temperaturen eingestellt werden kann. Sie wird dann vor dem Pressvorgang zur Mostgewinnung durch eine Ein-

richtung gepumpt/geströmt und dort mit über dem Querschnitt des Strömungskanals reichenden gepulsten elektrischen Feldern zur irreversiblen Öffnung der Zellwände der biologischen Zellen der Weinbeerenhaut beaufschlagt. Das ist die Elektroporation. Die Pulsdauer liegt in dem Bereich von 0,5 - 3 μ s. Während der Bepulsung wird die Maische pulsartig mindestens einmal, vorzugsweise mehrmals so hohen elektrischen Feldstärken ausgesetzt, dass einerseits die Potentialdifferenz an den 7 bis 10 μ m großen Zellen der Beerenhaut mindestens 100 V beträgt, das reicht für die irreversible elektrische Poration, und andererseits wird die Grenze zur Streamerbildung, die bei etwa 1 000 kV/cm liegt, nicht erreicht. Es hat sich gezeigt, dass die spezifische Energiedosis für elektrische Zellporation bei einer Temperatur der Maische ab 10°C bis etwa 40°C zwischen 10 und 40 kJ pro Kilogramm Maische liegt. Unterhalb etwa 10°C sollte sie um einen Faktor 2 bis 4 darüber eingestellt sein und oberhalb etwa 40°C um einen Faktor 2 geringer.

Danach erfährt die elektroporierte Maische eine vorgegebene Standzeit zur schnellen, schonenden und energieoptimierten Freisetzung der wertgebenden Inhaltsstoffe aus der Fruchtschale. Diese Freisetzung wird durch mindestens eine Probennahme aus der Maische mitverfolgt und die daraus gewonnen Daten über Stoffe und jeweilige Konzentration festgehalten. Schließlich wird die elektroporierte Maische im Anschluß an die Standzeit dem Pressvorgang zur Gewinnung des Mostes ausgesetzt. Der Most ist der Beginn des eigentlichen Weinausbaus.

In den Unteransprüchen 2 bis 5 werden weitere Verfahrensschritte spezifiziert. So erfährt nach Anspruch 2 die Maische aus Weißweintruben nach der Elektroporation eine Standzeit von wenigen Minuten bis zu mehrere Stunden.

Anders bei Rotweintruben, nach Anspruch 3 erfährt da die Maische nach der Elektroporation eine Standzeit von wenigen Stunden bis mehreren Tage.

Daraus ergibt sich, dass die elektroporierte Maische zur Mostgewinnung allerhöchstens noch einem Pressdruck wie bei der herkömmlichen Mostgewinnung ausgesetzt werden braucht, erfahrungsgemäß, durchaus ausreichend, einem 30% niedrigerem.

Zur irreversiblen Elektroporation wird die Maische entweder kontinuierlich oder schubweise durch die Einrichtung zur Elektroporation gefahren. Der kontinuierliche Durchflussbetrieb ist der üblichere.

Ausgehend von herkömmlichen Wein-Most-Gewinnungs-/ Erzeugungsanlagen in Weinkellereien, ist die Einrichtung zur Durchführung des Verfahrensschrittes der irreversiblen Elektroporation der Maische nach Anspruch 7 mit einer dielektrischen Rohrleitung, dem Strömungskanal für die Maische, mit einfach rundem oder einfach polygonalem, mindestens viereckigem Querschnitt realisiert. Beim runden Querschnitt soll die Konturlinie durchgehend nach außen, konstant oder veränderlich gewölbt sein, also keine Richtungsänderung des Krümmungsradius haben. Beim polygonalen Querschnitt sollen unmittelbar benachbarte Mantelsegmentflächen nach innen einen Winkel $\geq 90^\circ$ bilden und der Querschnitt auch nur nach außen gewölbt sein. Für den runden und polygonalen Fall ergibt das die günstigsten Strömungsverhältnisse für die Maische. In der Wand dieses Strömungskanals sind mindestens zwei Elektroden auf Abstand zueinander eingelassen. Die Elektroden sitzen versenkt oder bündig in der Wand des Strömungskanals oder ragen aus dieser Wand in den Strömungskanal.

Die gesamte Oberfläche der in den Strömungskanal ragenden blanken Elektrodenflächen bestimmt die Steuerung/Begrenzung des Stromes zwischen den Elektroden.

Der lichte Querschnitt und die Länge des Strömungskanals der Einrichtung sind so ausgelegt, dass die Maische als elektrolytische Last der Einrichtung mindestens so groß ist wie die Impedanz eines an die Einrichtung angeschlossenen Hochspannungs-

Pulsgenerators. Durch diesen Tatbestand sind die Schranken für die Dimensionierung des Strömungskanals und für die exponierte Fläche der Elektroden vorgegeben.

In den Unteransprüchen 8 bis 11 ist die Einrichtung zur Elektroporation der Maische unterschiedlich spezifiziert. Die in den Strömungskanal exponierten Stirnflächen der jeweiligen Elektroden zur Ausbildung des pulsformigen elektrischen Feldes zwischen ihnen stehen einander nach Anspruch 8 senkrecht zur Strömungsachse gegenüber und reihen sich als Elektrodenpaare unter Abstandswahrung strömungsaxial aneinander oder reihen sich unter Abstandswahrung zickzackförmig strömungsaxial ausgerichtet oder um die Strömungsachse gewunden aneinander.

Nach Anspruch 9 sind die Elektroden ringförmig und reihen sich unter Abstandswahrung coaxial zur Strömungsachse hintereinander.

Nach Anspruch 10 sind die Elektroden stiftförmig, ragen radial in den Strömungskanal und sind wie in Anspruch 8 positioniert. Zur Vermeidung elektrischer Feldüberhöhungen sind die Elektroden an ihren Konturen nach Anspruch 11 abgerundet. Die elektrische Feldstärke darf wegen der Gefahr der Streamerbildung 1 000 kV/cm nicht überschreiten, weil dabei starke, empfindlich störende chemische Zersetzung in der Maische auftritt.

Lebensmittelgesetzlich besteht bei der Einrichtung die Vorgabe, wie sie in Anspruch 12 durch die Art des Baumaterials für den Strömungskanal ausgedrückt ist, nämlich der Strömungskanal und die darin eingebauten Elektroden zumindest an ihrer von der Maische berührten Oberfläche sind mit einem für Lebensmittel geeigneten, für den Prozess inerten Material bedeckt oder bestehen daraus. Als dielektrisches Material eignet sich beispielsweise PE und als Elektrodenmaterial erfüllt beispielsweise Edelstahl die Anforderungen.

Der Massendurchsatz pro Zeit, die Durchsatzrate, bestimmt die Größe der lichten Fläche dieser Einrichtung zur Elektroporation und die Strömungsgeschwindigkeit. Dabei soll während des Betriebs keine Verstopfung auftreten. Hindernisse, die solches verursachen können müssen vermieden werden. Auch deswegen sind die Elektrodenkonturen rund.

Die irreversible elektrische Zellporation der Wandzellen von Weinbeeren in der Maische stellt ein Verfahren zur Mostgewinnung dar, bei der die Pflanzenzellen durch das gepulste elektrische Feld schonend geöffnet und die bedeutsamen, wertgebenden Inhaltsstoffe effektiv freigesetzt werden. Vorteil bei der irreversiblen Elektroporation ist die schnelle, insbesondere nicht-thermische Extraktion von Farb-, Gerb-, Aroma- und den weiteren bedeutenden Inhaltsstoffen für den Weinausbau, wie Enzyme, wozu des weiteren auch Stickstoffsubstanzen aus den beerenspezifischen Eiweißen zählen.

Die elektrische Zellporation stellt für die Weinkellereiwirtschaft eine energiesparende, wirtschaftliche Alternative zur Maischegärung, Gärung nach Maischeerhitzung bzw. zu längeren Maischestandzeiten dar. Die Elektroporation von Maische aus Weinbeeren lässt eine Optimierung der Maschinenkapazitäten zu und führt beim Weinausbau schließlich zu einer wenigstens vergleichbaren Weinqualität. Infolge des irreversiblen und damit effektiven Zellaufschlusses werden auch die für die Hefeernährung notwendigen Stickstoffsubstanzen, die beispielsweise durch die heraus gelösten Eiweiße geliefert werden, besser extrahiert, das trägt zu einer verbesserten Gärung und durch Vermeidung der so genannten **UnTypischen Alterungsnote (UTA)** zu haltbaren Weinen bei.

Zum Verständnis der verwendeten Prozessparameter ist es notwendig den Mechanismus der irreversiblen elektrischen Zellporation von pflanzlichen Zellen insbesondere der Zellen in der

Beerenhaut genauer zu betrachten. Die inneren Teile von der biologischen Zelle, wie Zellkern, Zytoplasma etc., sind von außen durch die Zellwand getrennt, die aus einer extrem dünnen Schicht auf der Basis von Fettmolekülen besteht, die auch mit Bilipidschicht bezeichnet wird. Eine wichtige biologische Funktion der Zellwand ist ihre Fähigkeit, durch von der Zelle selbst erzeugte elektrische Potentiale Ionenkanäle zu generieren. Die natürlichen elektrischen Potentiale liegen in der Regel unterhalb bei ca. 70 mV. Durch äußere elektrische Felder kann das Potential künstlich erzeugt und soweit angehoben, so dass sich die Zellwandöffnung irreversibel ausweitet. Dabei ist das Potential durch die Multiplikation des effektiven Weges der Feldlinie in der Zelle mal dem Betrag der Feldstärke bestimmt. Beträgt zum Beispiel die Feldstärke am Ort der Zelle 10kV/cm und hat die Zelle am Ort der Feldlinie einen Durchmesser von 10 μm , errechnet sich das Potential zu 10 Volt. In der Literatur (siehe z. B.: K. H. Schoenbach et al., "Bacterial Decontamination of Liquids with Pulsed Electric Fields", Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation, Vol 7 No. 5, p. 637-654, October 2000) werden dazu folgende Werte angegeben: In Fällen von langen Pulsen, hier Pulsen im msec-Bereich, müssen die Potentiale in der Größenordnung von 1 Volt sein. Für kürzere Pulse, Pulse im μsec -Bereich, müssen die Potentiale an den Zellmembranen auf Werte bis 10 Volt angehoben werden.

Untersuchungen und Modelle zum Mechanismus der Zellporation werden an Bakterien schon länger durchgeführt. Ein wesentliches Ergebnis dieser Untersuchungen betrifft die Dynamik der Zellporation. Während sich nach Anlegen eines elektrischen Feldes die Polarisierungseffekte der im Zytoplasma enthaltenen Salze auf einer 100 ns Skala vollziehen, benötigt die Dynamik der irreversiblen Öffnung der Poren in der Zellmembran eine Größenordnung mehr Zeit. Die Analysen zeigen, dass die Irreversibilität nur dann eintritt, wenn die Poren sich unnatür-

lich weit geöffnet haben. Dazu ist eine Zeitspanne von etwa 1 bis 3 Mikrosekunden vonnöten, und das Zellporationspotential muss 10 Volt betragen. Das bedeutet für die Beerenhaut von Weinbeeren mit einem mittleren Zelldurchmesser von 7 μm , dass zur Erzielung eines Potentials von mindestens 10 V pro Zelle elektrische Feldstärken von mindestens 14 kV/cm erforderlich sind. Untersuchungen zeigen aber, dass die Poration der Zellen aus der Beerenhaut bei diesen Feldstärken nicht vollständig und das Ausfließen des Farbstoffes (Anthocyans) auch nach 24 Stunden noch nicht abgeschlossen ist. Zur sicheren Elektroporation wird deshalb mit einem Elektroporationspotential von mindestens 100 V gearbeitet, was elektrische Feldstärken von mindestens 140 kV/cm erfordert, die aber nur lokal in einer inhomogenen Feldkonfiguration zu erreichen sind.

Zur Durchführung des Verfahrens ist es entscheidend, dass die Energie zur elektrischen Zellporation auf gepulstem Wege zugeführt wird. Für Weintraubenmaische beträgt die Leitfähigkeit der Suspension um 0,26 S/m. Würde man zum Beispiel an einen mit Weintraubenmaische gefüllten, würfelförmigen dielektrischen Trog der Seitenlänge 10 cm, in dem zwei gegenüberliegenden Seiten Elektroden sind, ein elektrisches Feld in Höhe von 10 kV/cm anlegen, dann würde ein Strom von ca. 20 kA fließen, der zu einer Leistungsaufnahme von ca. 2 000 MW führt. Das entspricht der Leistungsabgabe von einem Kraftwerk. Es ist deshalb unrealistisch die Zellporation mit Methoden von geschalteten Gleich- und Wechselstrom durchführen zu wollen. Es ist vielmehr das Regime von Hochleistungspulsanlagen, gepulst solche Leistungsspitzen zu erzeugen.

Die Dynamik der Porenöffnung ist stark temperaturabhängig. Die Ursache liegt in den thermischen Schwankungen der Lipidmoleküle in der Bilipidschicht der Zellmembrane/-haut. Unter der Wirkung der Temperatur bilden sich statistisch Poren mit einem Durchmesser von ca. 1 nm, die sich schnell wieder verschlie-

Ben. Entscheidend ist, dass während der Dauer des Pulses ein oder mehrere Poren vorhanden sind, die dann unter der Wirkung des hinreichend hohen elektrischen Feldes irreversibel weit geöffnet werden. Je kälter das Prozessiergut ist, desto intensiver muss in Bezug auf Feldstärke und Energie die Zellporation durchgeführt werden. In Zahlen bedeutet das, dass die Werte der Energiedosis einen Faktor 2 höher sein müssten, wenn die Temperatur der Maische unter 10 °C liegt. Analog dazu dürfen die Werte der Energiedosis einen Faktor 2 geringer gewählt werden, wenn die Temperatur der Maische 30 bis 40°C beträgt.

Im folgenden wird die irreversible Elektroporation näher erläutert. Es zeigt:

Fig. 1 zeitlichen Verlauf des Gerbstoffauszugs;

Fig. 2 zeitlichen Verlauf des Farbstoffauszugs;

Fig. 3 Aromastoffe von Rieslingwein nach Zellporation der Maische;

Fig. 4 sich gegenüberstehende Elektroden;

Fig. 5 koaxiale, sich gegenüberstehende Elektroden;

Fig. 6 stabförmige Elektrodenanordnung;.

Fig. 7 inhomogenen Potentiallinienverlauf zwischen zwei stabförmigen Elektroden.

Die Rotweinbereitung:

Die Spätburgundermaische wird bei Raumtemperatur mittels einer Lebensmittelpumpe über ein Rohrleitungssystem durch eine Reaktoranordnung mit inhomogenem Feld gepumpt (s. Fig. 6). Die Förderleistung ist 1000 l/h und die Wiederholfrequenz der 300 kV Pulse beträgt 10 Hz was einer die spezifische Energie von 20 kJ/kg Maische entspricht. Alternativ in einem Reaktor mit annähernd homogenem elektrischem Feld (wie in den Fig. 4 und 5 dargestellt) wird hier die Temperatur der roten Maische auf 30 bis 40 °C angehoben werden. Als Kontrolle dient die Maischeerhitzung als herkömmliche Art des Aufschlusses. Es zeigt sich,

dass die zeitliche Entwicklung des Extraktionsvorgangs bei der elektrischen Zellporation vergleichbar der der thermischen Denaturierung ist. In Fig.1 und 2 ist die zeitliche Entwicklung von Gerbstoff und Farbintensität von roter Maische nach einer irreversiblen elektrischen Zellporation dargestellt. Das Extraktionsverhalten ist vergleichbar mit der Maischeerhitzung, nämlich dass innerhalb der ersten zwei bis drei Stunden der hauptsächliche Gerbstoff- und Farbauszug stattfindet, nur mit dem Unterschied dass hier die Maische bei Raumtemperatur zellporiert wurde.

Wie sich aus Tabelle 1 ergibt, liegt der durch Zellporation gewonnene Rotmost in seinem Gerbstoff- und Säuregehalt nur geringfügig niedriger als der durch Maischeerhitzung erhaltene. Das kann aber durch Variation Parameter beeinflusst werden. In beiden Fällen wird anschließend abgepresst, vorgeklärt und vergoren. Der fertige Wein entspricht in seinen analytischen Eckdaten besonders auch den Farb- und Gerbstoffwerten der Kontrolle.

Bei der Blindverkostung durch 48 fachkundige Personen der Weinkellerei erwiesen sich beide Varianten als gleichrangig: 23-mal wurde die elektrische Zellporation auf Rang 1 gesetzt, 25-mal die Kontrolle. Bei der Bewertung nach dem 5-Punkteschema der deutschen Weinverordnung erreichte der mittels irreversibler elektrischer Zellporation bereitete Rotwein im Mittel die Qualitätszahl 2,15, die Kontrolle 2,17, $n = 42$ Ereignisse, was auch hier als ununterscheidbar gewertet werden muss. Das Beispiel zeigt, dass die elektrische Zellporation zumindest vergleichbare Ergebnisse wie die Maischeerhitzung liefert.

Der Weißwein:

Die Elektroporation liefert eine gute Ausgangsbasis beim Ausbau von Weißwein, wie das folgende Beispiel zeigt: Das Ries-

ling-Lesegut wurde abgebeert, gemaischt und anschließend sowohl bei ausgeschalteter (zur Kontrolle) als auch eingeschalteter elektrischer Zellporation durch die Anlage gepumpt. Die mechanische Belastung der Maische war somit gleich, und etwaige Unterschiede allein der zusätzlichen Wirkung der elektrischen Felder zuzuschreiben. Als weiterer Vergleich wurde das gleiche Lesegut mittels Ganztraubenpressung, GTP, verarbeitet.

Bei den gewonnenen Rohmosten zeigte die GTP erwartungsgemäß den niedrigsten Trubgehalt. Die elektrisch zellporierte Variante weist höhere Trubgehalte auf. Das ist hauptsächlich auf die Pumpbelastung zurückzuführen.

Bei den durch Sedimentation vorgeklärten Mosten sind die Unterschiede im Trubgehalt nur noch gering, auffallend bei der elektrisch zellporierten Variante sind hier zum einen wiederum die niedrigeren Säurewerte, zum anderen aber die hier höheren Gehalte an Gerbstoff und hefeverfügbarem Stickstoff (ferm-N-Wert). Das sind Vorteile im Hinblick auf die Vermeidung der untypischen Alterungsnote, UTA.

Beim ausgebauten Wein der elektroporierten Variante findet sich ein höherer Gerbstoffgehalt sowie ein erhöhter zuckerfreier Extrakt. Der deutlich erhöhte Kalium-Wert dieser Variante, weist auf einen sehr effektiven Zellaufschluss hin.

Im Weißweinbereich ist die Freisetzung von Aromastoffen oder deren Vorstufen vor allem aus den Beerenhäuten von Interesse. Wie Fig.2 zu entnehmen ist, liefert die GTP die geringsten Gehalte an Terpenen und anderen Aromastoffen. Durch Maischen, hier verbunden mit einem Pumpvorgang, verbessert sich die Freisetzung der Aromen, die zusätzliche Elektroporation erbrachte hier nochmals eine deutliche Steigerung. Die Auslösung von niedermolekularen Stickstoffsubstanzen, Aminosäuren, Ammonium, aus der Zelle wird durch die Elektroporation gefördert -

und sie ist erwünscht, da Eiweiße hefeverwertbare Stickstoffträger darstellen, ohne deren ausreichende Mitwirkung Fehlgeruch und eine untypische Alterungsnote, UTAN, die Folge sind.

Das Ergebnis einer sensorischen Beurteilung ist:

Ein Prüfer-Panel aus 50 Kellermeistern wertete die Vergleichsvariante der Ganztraubenpressung ab wegen Tendenz zu Untypischer Alterungsnote (vgl. niedrigen ferm N-Wert des Mostes in Tabelle 2), desgleichen die etwas ruppig erscheinende Kontrollvariante, Einmaischen plus 1 Pumpvorgang. Klar bevorzugt und mit signifikantem Vorsprung auf Rang 1 gesetzt wurde dagegen die mittels zusätzlicher Elektroporation aufgeschlossene und entsprechend vollständiger extrahierte Variante. In Tabelle 2 ist das Prüfergebnis im Detail wiedergegeben.

Im Weißweinbereich sind somit Vorteile der Zellporation gegeben sowohl bei der besseren Extraktion der sortenspezifischen Aromen und Aromavorstufen als auch der Vermeidung der Untypischen Alterungsnote (UTAN).

Für Maische aus weißen Beeren ist ein starker Zellaufschluss wie bei der roten Maische nicht erwünscht, da die damit verbundene Gerbstoffauslösung den Charakter des Weißweines verändert/beeinflusst. Elektrische Feldstärke und spezifische Energie können zurückgenommen werden. In den Abbildungen 4 und 5 sind Reaktorkonzepte mit größerem Fließquerschnitt und einem Feldverlauf mit geringerer elektrischer Feldstärke dargestellt, der sich über ein größeres Volumen erstreckt. In Fig.5 sind die Elektroden axialsymmetrisch und in Fig.4 radial angeordnet. Mit dieser Elektrodenkonfiguration lassen sich großvolumige, im Feldachsenbereich annähernd homogene elektrische Felder erzeugen. In beiden Fällen wird die Inhomogenität des elektrischen Feldes zugunsten eines homogenen Feldes über einen größeren Volumenbereich durch Wahl flächiger Elektroden und großer Krümmungsradien in den Elektrodenformen reduziert.

Die mittlere elektrische Feldstärke beträgt in beiden Fällen bei 300 kV Pulsen ca. 60 kV/cm in der Amplitude.

In allen Reaktorkonzepten sind mindestens zwei Elektroden in die dielektrische Rohrleitung eingebaut, um die strömende Maische mindestens einmal mit hoher Feldstärke im Strömungsvolumen zu bepuslen. Die Oberfläche der in den Strömungskanal ragenden, blanken Elektrodenflächen dient zur Steuerung/Begrenzung des Stromes zwischen den Elektroden, wobei die elektrolytische Last der Einrichtung zur irreversiblen Elektroporation der Impedanz des angeschlossenen Hochspannungspulsgenerators zumindest in etwa angepasst ist. Vorteilhafterweise ist die Last im Vergleich zur Impedanz des Generators größer, so fließen höhere Ströme durch die Maische. Die Ströme bewirken in der Maische lokal die zur Zellporation notwendigen elektrischen Felder. Allerdings belasten höhere Ströme z.B. 20 kA die Lebensdauer der verwendeten Hochspannungspulsgeneratoren.

In der Fig. 6 ist eine Reaktorversion zur irreversiblen Elektroporation von roter Maische dargestellt. Sie besteht aus einer dielektrischen Rohrleitung, dem Strömungskanal für die Maische, mit rundem oder polygonalem, mindestens viereckigem Querschnitt, die eine Fläche entsprechend ca. 4 cm² aufweist, in deren Wand mindestens ein im Abstand von 6 cm versetztes Elektrodenpaar eingelassen ist, dessen beide Elektroden bündig, in den Strömungskanal ragend, eingebaut sind, und die Elektrodenstäbe Krümmungsradien im Bereich $r = 6$ mm aufweisen. Die elektrische Feldachse schneidet hier die Strömungsachse schräg. In der Figur 7 sind die elektrischen Potentiallinien zwischen zwei das elektrische Feld bildende Stabelektroden eingezeichnet, welche die starke, ausgeprägte Inhomogenität der Elektrodenanordnung aufzeigen. In der Ausführung von Figur 6 erreicht die Feldstärke im unmittelbaren Bereich der Elektrode bei 300 kV Pulsamplitude eine elektrische Feldstärke bis

230 kV/cm. Lokal sind in der Umgebung der Elektroden die gewünschten Elektroporationspotentiale von ≥ 100 V zu erreichen.

Allen drei Elektrodenkonfigurationen liegt hinsichtlich ihrer im Strömungskanal exponierten Fläche die folgende, dimensionierungswichtige Elektrodenfläche zugrunde:

Figur 4: Die drei Elektrodenpaare aus ebenfalls nicht rostendem Stahl sind radial angeordnet. Die scheibenartigen Elektroden haben einen Durchmesser von 40 mm und weisen eine Krümmungsradius von 10 mm auf. Die Separation der Elektroden ist 50 mm und es stellen sich bei einem 300 kV Puls, je nach Lage, Feldstärken im von 45 bis 80 kV/cm in der Pulsamplitude ein.

Der Querschnitt des Fließkanals ist zur Vermeidung von parasitären elektrischen Entladungen über die Innenwand oval gestaltet.

Figur 5: Die axialsymmetrischen Elektroden bestehen aus nichtrostendem Stahl, Edelstahl, der Isolierkörper aus Polyethylen. Der Durchmesser des Fließquerschnitts beträgt 50 mm, die Separation der gerundeten Elektroden ca. 70 mm. Der Krümmungsradius der zur Gegenelektrode weisenden, gekrümmten Fläche beträgt 20 mm. Die maximal auftretende Feldstärke bei einem 300 kV Puls übersteigt 50 kV/cm nicht.

Figur 6: Der Strömungskanal hat einen Durchmesser von 20 mm. Die Elektroden aus Edelstahl sind zur Realisierung der Hochspannungsfestigkeit um 60 mm versetzt angeordnet und bilden elektrische Felder nach beiden Richtungen. Ausnahme sind die Randelektroden, die geerdet sind und nur ein Feld zu dem auf Hochspannung stehenden Nachbar ausbilden. In Fig. 6 sind es Felder von 6 Elektrodenpaaren, die aus 7 Elektroden gebildet werden. Die Elektroden ragen jeweils halbkugelig mit einem Krümmungsradius von 6 mm in den Kanal hinein. Die Feldstärke bei einem 300 kV Puls variiert zwischen 40 und 230 kV/cm am Scheitelwert.

Die drei Dimensionierungsbeispiele sind beispielhaft.

Die Elektroden der Einrichtung zur irreversiblen Elektroporation sind an den Ausgang eines Hochspannungsimpulsgenerators, der elektrischen Energiequelle, angeschlossen. Die im Strömungskanal aufeinanderfolgenden / aneinandergereihten Elektroden liegen abwechselnd auf einem Bezugspotential, meist Erdpotential, und am Hochspannungsausgang des zugehörigen Hochspannungspulsgenerators. Im Falle einer geradzahligen Elektrodenanzahl hat man wenigstens ein Elektrodenpaar oder aneinandergereihte Elektrodenpaare. Im Falle einer ungeradzahligen Elektrodenanzahl wird die erste und letzte Elektrode aus Schutzgründen vorteilhafterweise an das Bezugspotential angeschlossen. Kommt eine Einrichtung, wie in Fig. 4 mit radialer Elektrodenanordnung gezeigt, zum Einsatz, sind bipolare Ausgangspulse des Pulsgenerators aus isolationstechnischem Aufwand zweckmäßig. Zwischen beiden felderzeugenden Elektroden stellt sich das Bezugspotential selbsttätig ein.

Als Generator zur Erzeugung von Hochspannungspulsen im Mikrosekunden bis Submikrosekundenbereich mit einer Amplitude von 300 bis 500 kV und Anstiegszeiten im 100 ns-Bereich, bei Stromstärken unterhalb 10 kA und Pulslängen um eine Mikrosekunde bietet sich der Marxgenerator bzw. ein als LC-Kettenleiter ausgebildeter Marxgenerator an. Typischerweise besteht ein in diesem Anwendungsgebiet eingesetzter Marxgenerator aus 6 Stufen. Über ein Hochspannungnetzgerät werden die einzelnen Stufen/Kondensatoren, die eine Einzelkapazität von 140 nF aufweisen auf 50 kV aufgeladen. Beim Entladen/Durchzünden entsteht dann der Hochspannungspuls mit einer Amplitude von $6 \times 50 \text{ kV} = 300 \text{ kV}$ und einer aperiodischen Pulslänge von ca. $1,5 \mu\text{s}$ für eine angepasste ohmsche Last von ca. 20 Ohm. Im einfachsten Fall, bei beispielsweise nur einem Marxgenerator, werden die Schalter/Funkenstrecken im Marxgenerator im Selbstdurchbruch betrieben. Beim Schalten mehrerer Marxgeneratoren in einer Anlage müssen Triggerein-

richtungen für das gezielte Zünden der Funkenstrecken verwendet werden.

Um den aperiodischen Grenzfall im Reaktor zu erreichen muss die Fläche der Elektroden einen Wert haben, der sich für einen planaren elektrolytischen Widerstand nach der Formel $\frac{1}{R} = \frac{L \cdot F}{d}$

berechnet. Wird beispielsweise für den Generatorwiderstand $R = 20 \, \Omega$ und für die elektrolytische Leitfähigkeit L den Wert für die Maische von $0,26 \, \text{S/m}$ eingesetzt, dann errechnet sich als Anhalt bei einem Abstand $d = 0,06 \, \text{m}$ die Fläche zu $0,01 \, \text{m}^2$. Das entspricht einem Quadrat von $10 \, \text{cm} \times 10 \, \text{cm}$. Diese Fläche geteilt, führt auf vier Elektrodenpaare mit einer Elektrodenfläche von je $25 \, \text{cm}^2$. Tatsächlich muss die Fläche kleiner angesetzt werden, da an den inhomogenen Randfeldern stets höhere Ströme fließen.

Tab.1: Zellporation zur Rotweinbereitung (Spätburgunder Rotwein)

	Most (vorgeklärt)					Wein										
	Mostgewicht (°Oe)	Schleu- dertrub (%)	Gerbstoffe (g/l)	Gesamtsäure (g/l)	pH-Wert	Alkohol (g/l)	Gesamtex- trakt (g/l)	zfr. Ex- trakt (g/l)	Gesamtsäure (g/l)	pH-Wert	freie SO ₂ (mg/l)	gesamte SO ₂ (mg/l)	Gerbstoffe (mg/l)	Farbinten- sität	Farbnuance	Rangziffer
Kon- trol- le (ME)	96,5	1,21	2,8	8,3	3,5	98,5	25,1	23,8	4,7	3,7	48	131	2,1	2,4 7	0,9 5	2,1 7
Zell- pora- tion	96,0	1,37	2,3	6,9	3,5	104,2	24,7	23,2	4,1	3,7	51	121	2,0	2,3 3	1,0 2	2,1 5

Tab.2: Zellporation zur Weißweinbereitung (Riesling)

	Most (vorgeklärt)					Wein									
	Mostge- wicht (°Oe)	Gesamt- säure (g/l)	Schleu- dertrub (%)	Gerbstoffe (g/l)	ferm N-Wert	Alkohol (g/l)	Gesamtex- trakt (g/l)	zfr. Ex- trakt (g/l)	Gesamtsäu- re (g/l)	pH-Wert	freie SO ₂ (mg/l)	gesamte SO ₂ (mg/l)	Gerbstoffe (g/l)	Kalium (mg/l)	Rangziffer
Vergleich (GTP)	82	11,1	0,80	0,2 2	25	99,0	21,5	18,2	6,7	3,1	44	85	0,2 6	498	2,3
Kontrolle (nur ge- pumpt)	77	9,2	0,97	0,3 3	32	96,2	19,4	19,3	6,7	3,1	43	83	0,3 3	585	2,5
Zellpora- tion (gepumpt)	79	8,6	0,80	0,5 7	37	98,9	20,6	20,5	6,8	3,2	41	92	0,3 8	776	1,3

Forschungszentrum
Karlsruhe GmbH
ANR 5661498

Karlsruhe, den 19. März 2004
PLA 0413 WM/KB

Patentansprüche:

1. Verfahren zur besseren und schonenden Freisetzung wertgebender Inhaltsstoffe aus Weintrauben:

bestehend aus den Verfahrensschritten:

- eine aus roten und/oder weißen Weintrauben gewonnene Maische wird auf einer Temperatur gehalten/gebracht, die oberhalb des Gefrierens der Maische liegt und bis zu bei der herkömmlichen Maischeerwärmung bekannten Temperaturen eingestellt wird,
- die Maische wird vor dem Pressvorgang zur Mostgewinnung durch eine Anlage/einen Anlagenteil gepumpt/geströmt und dort mit gepulsten elektrischen Feldern zur irreversiblen Öffnung der Zellwände der biologischen Zellen der Weinbeerenhaut beaufschlagt, die Elektroporation, deren Pulsdauer im Bereich von 0,5 - 3 μ s liegt,
- die Maische erfährt bei der Elektroporation pulsartig so hohe Feldstärken, dass einerseits die Potentialdifferenz an den 7 bis 10 μ m großen Zellen der Beerenhaut mindestens 100 Volt beträgt und andererseits die Grenze zur Streamerbildung, die bei etwa 1 000 kV/cm liegt, nicht erreicht wird,
- die spezifische Energiedosis für elektrische Zellporation wird bei einer Temperatur der Maische ab 10°C bis etwa 40°C zwischen 10 und 40 kJ pro Kilogramm Maische eingestellt,

unterhalb etwa 10°C um einen Faktor 2 bis 4 darüber und oberhalb etwa 40°C um einen Faktor 2 geringer eingestellt wird.

- die Maische erfährt nach der Elektroporation eine vorgegebene Standzeit zur Freisetzung der wertgebenden Inhaltsstoffe aus der Fruchtschale in die Maische und diese Freisetzung wird durch mindestens eine Probennahme aus der Maische mitverfolgt
- die Maische wird im Anschluss an die Standzeit einem Pressvorgang zur Gewinnung des Mostes ausgesetzt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Maische aus Weißweintruben nach der Elektroporation eine Standzeit von Minuten bis mehrere Stunden erfährt.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Maische aus Rotweintruben nach der Elektroporation eine Standzeit von etwa 1 Stunde bis mehrere Tage erfährt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Maische zur Mostgewinnung höchstens einem Pressdruck wie bei der herkömmlichen Mostgewinnung ausgesetzt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Maische kontinuierlich oder schubweise durch die Anlage/den Anlagenteil zur Elektroporation gefahren wird.
6. Most aus Weintrauben und aus diesem Most erzeugter Wein, dadurch gekennzeichnet, dass die Maische zur Gewinnung dieses Mostes und Weins zumindest teilweise den Verfahrensschritt der Elektroporation nach einem der Ansprüche 1 bis

5 durchlaufen hat.

7. Einrichtung zur Durchführung der Elektroporation einer Maische aus Weintrauben, dadurch gekennzeichnet, dass

- die Anlage/der Anlagenteil zur Elektroporation aus einer dielektrischen Rohrleitung, dem Strömungskanal für die Maische, mit einfach rundem oder einfach polygonalem, mindestens jedoch viereckigem Querschnitt besteht, in dessen Wand mindestens zwei, zueinander auf Abstand stehende Elektroden zur Bildung eines pulsformigen, elektrischen Feldes zwischen ihnen eingelassen ist,
- die Elektroden versenkt oder bündig oder in den Strömungskanal ragend eingebaut sind,
- die gesamte Oberfläche der in den Strömungskanal ragenden blanken Elektrodenflächen zur Steuerung/Begrenzung des Stromes zwischen den Elektroden dient, wobei der lichte Querschnitt und die Länge des Strömungskanals der Einrichtung so ausgelegt ist, dass die Maische als elektrolytische Last der Einrichtung einen elektrischen Widerstand hat, der höchstens so groß wie die Impedanz eines an die Einrichtung angeschlossenen Hochspannungsimpulsgenerators ist.

8. Einrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden einander zur Strömungsachse schräg dazu/versetzt oder einander zur Strömungsachse paarweise senkrecht gegenüberstehen und im Fall mehr als zwei Elektroden dieselben zur Strömungsachse ausgerichtet oder darum verdreht im Abstand strömungsaxial aufeinander folgen.

9. Einrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden ringförmig sind und coaxial zur Strömungsachse aufeinander folgen.
10. Einrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden stiftförmig sind und sich entlang zur Strömungsachse unter Abstandswahrung ausgerichtet oder darum verdreht aneinanderreihen.
11. Einrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die in den Strömungskanal exponierte Stirn der jeweiligen Elektrode an ihrer Kontur derart abgerundet ist, dass bei pulsförmiger Felderzeugung an allen Konturbereichen der Elektrode sich stets höchstens eine elektrische Feldstärke von 1 000 kV/cm ausbilden kann und für die durchströmende Maische die exponierte Elektrodengeometrie nicht als Stauinitiierung wirkt.
12. Einrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Strömungskanal und die darin eingebauten Elektroden zumindest an ihrer von der Maische berührten Oberfläche mit einem lebensmittelgeeigneten, für den Prozess inerten Material bedeckt sind oder daraus bestehen.

Zusammenfassung

Ein Verfahren zur besseren und schonenden Freisetzung wertgebender Inhaltsstoffe aus Weintrauben wird über Elektroporation der aus roten und/oder weißen Weintrauben gewonnenen Maische erreicht. Hierzu wird die Maische vor dem Pressvorgang zur Mostgewinnung durch eine Anlage/einen Anlagenteil gepumpt/geströmt und dort mit gepulsten elektrischen Feldern zur irreversiblen Öffnung der Zellwände der biologischen Zellen der Weinbeerenhaut beaufschlagt.

Die Einrichtung zur Durchführung der Elektroporation der Maische besteht aus einer dielektrischen Rohrleitung, dem Strömungskanal für die Maische, in dessen Wand mindestens zwei, zueinander auf Abstand stehende Elektroden zur Bildung eines pulsformigen, elektrischen Feldes zwischen ihnen eingelassen ist.

Die Maische hat als elektrolytische Last der Einrichtung einen elektrischen Widerstand, der höchstens so groß wie die Impedanz eines an die Einrichtung angeschlossenen Hochspannungsimpulsgenerators ist.

Extraktion der Gerbstoffe nach Elektroporation

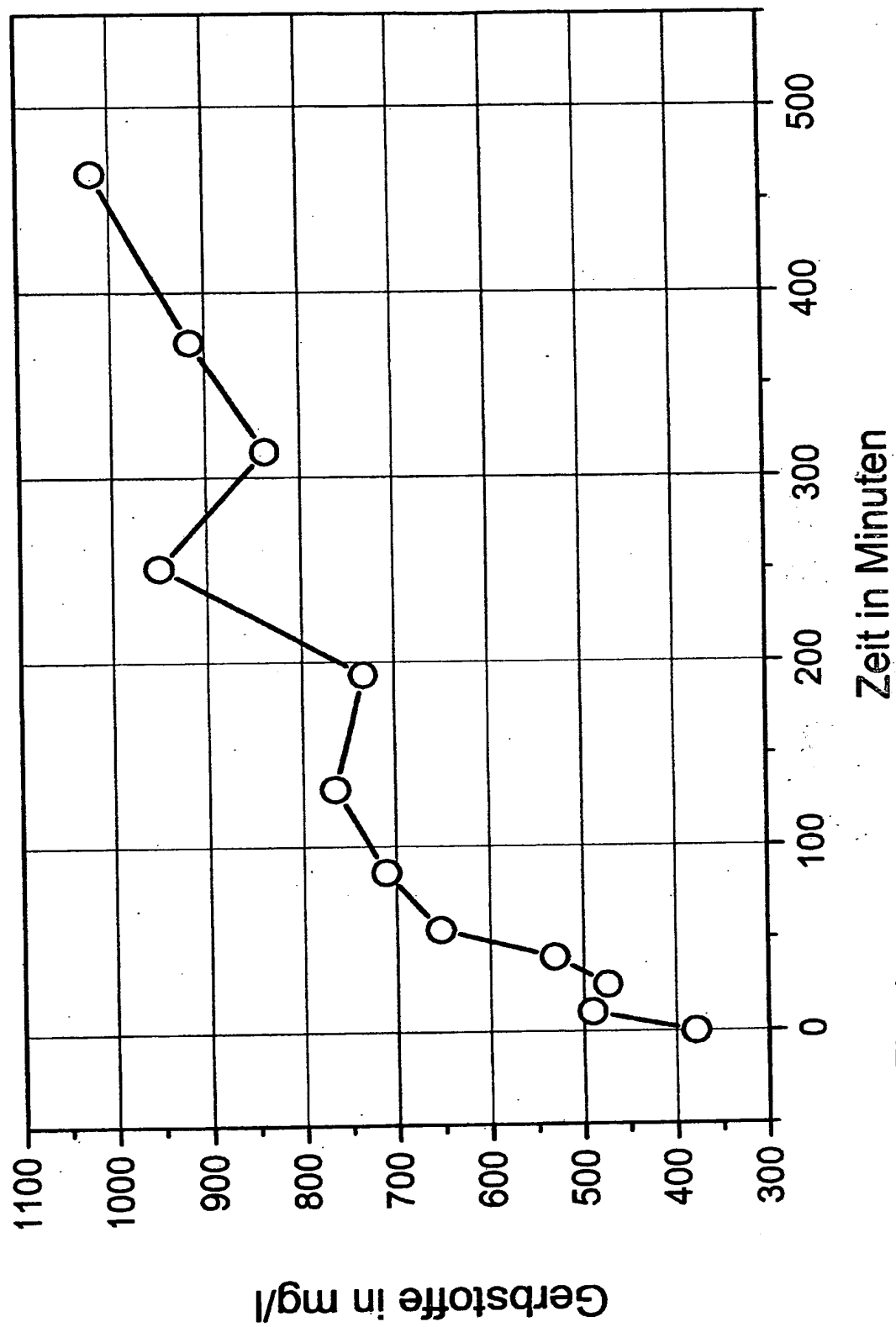


Fig. 1

Extraktion von Anthocyan nach Elektroporation

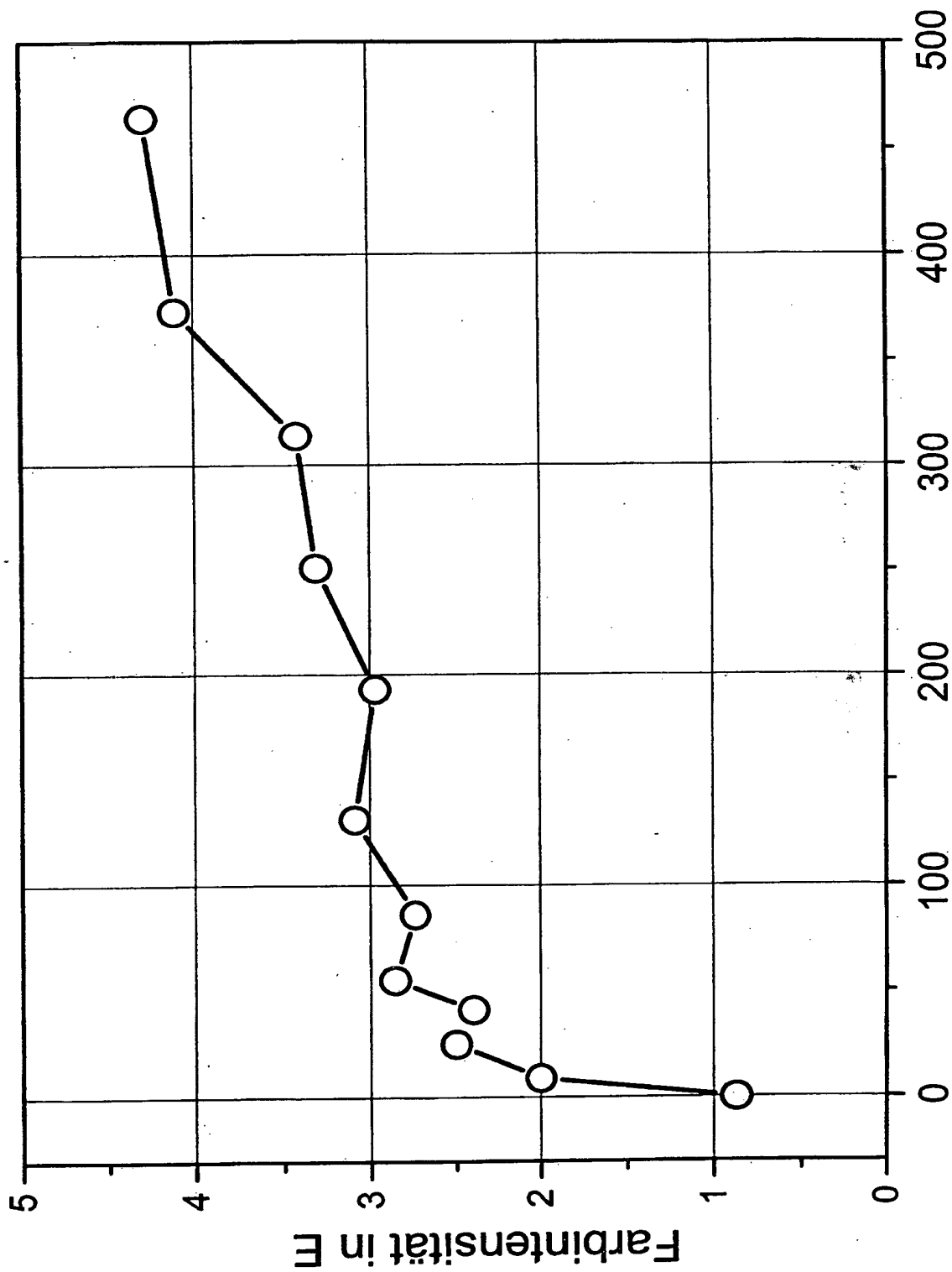


Fig. 2

Zeit in Minuten

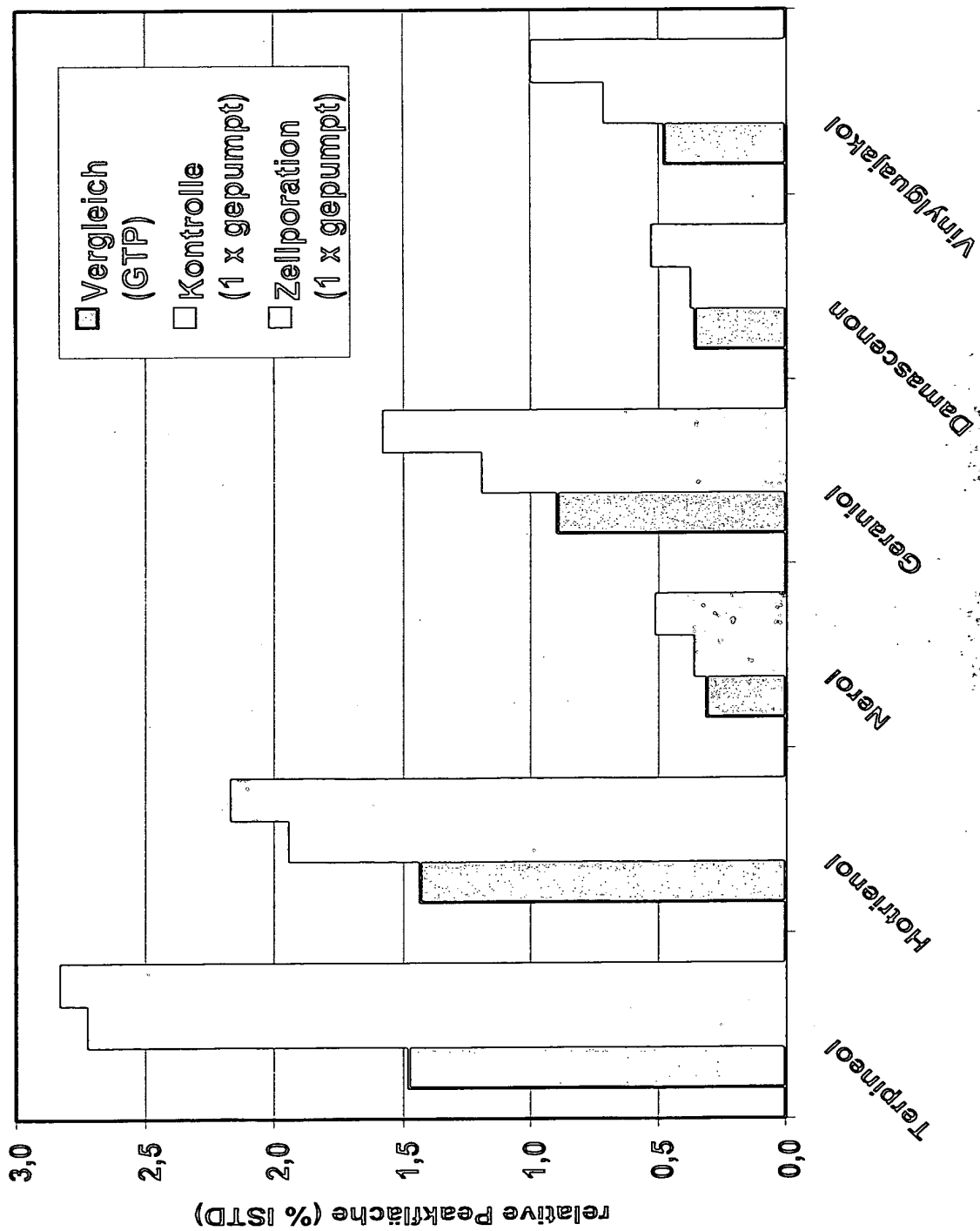


Fig. 3

PLA 0413

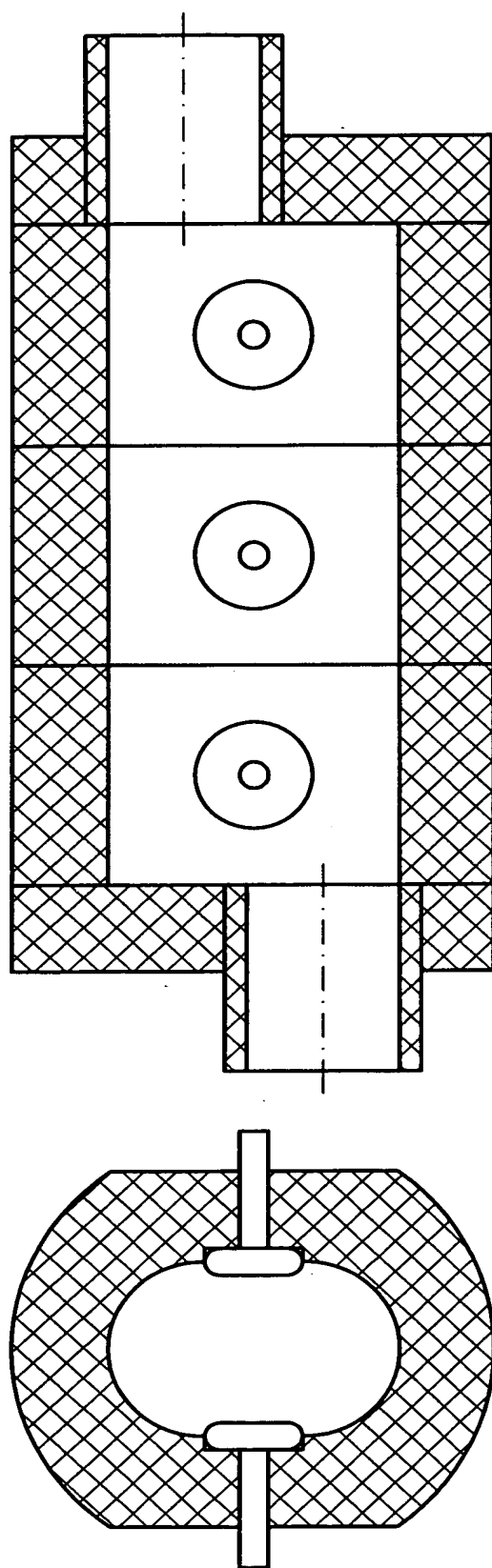


Fig. 4

PLA 0413

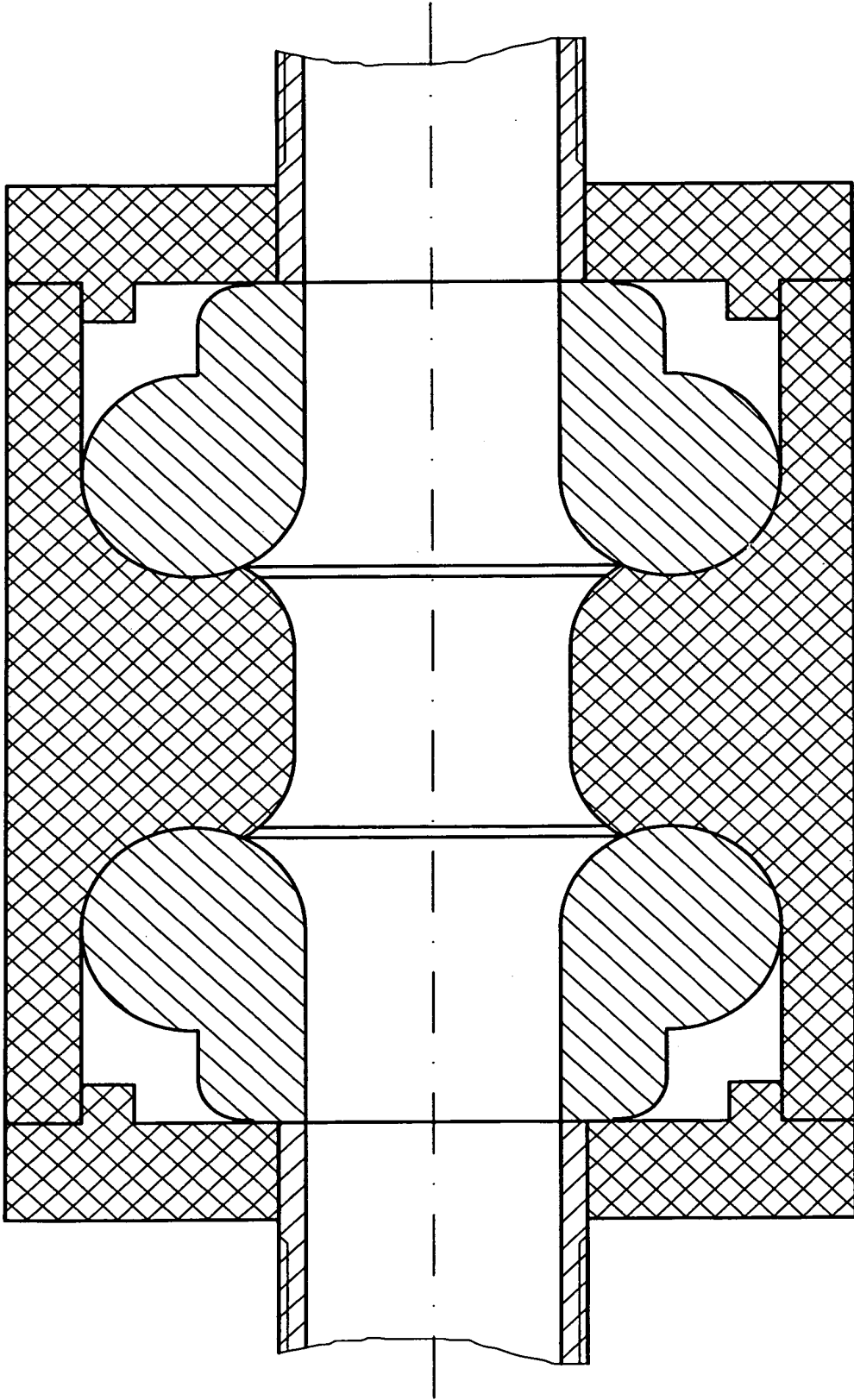
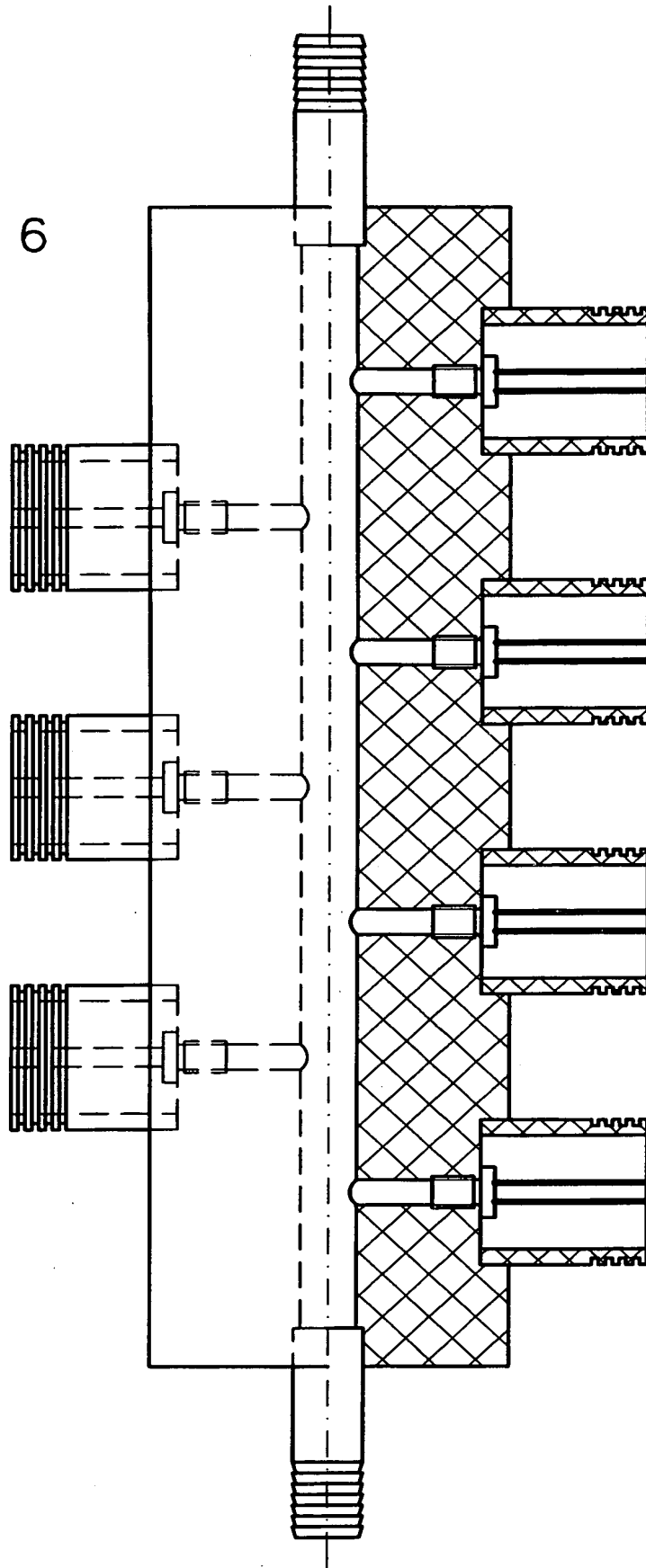


Fig. 5

Fig. 6



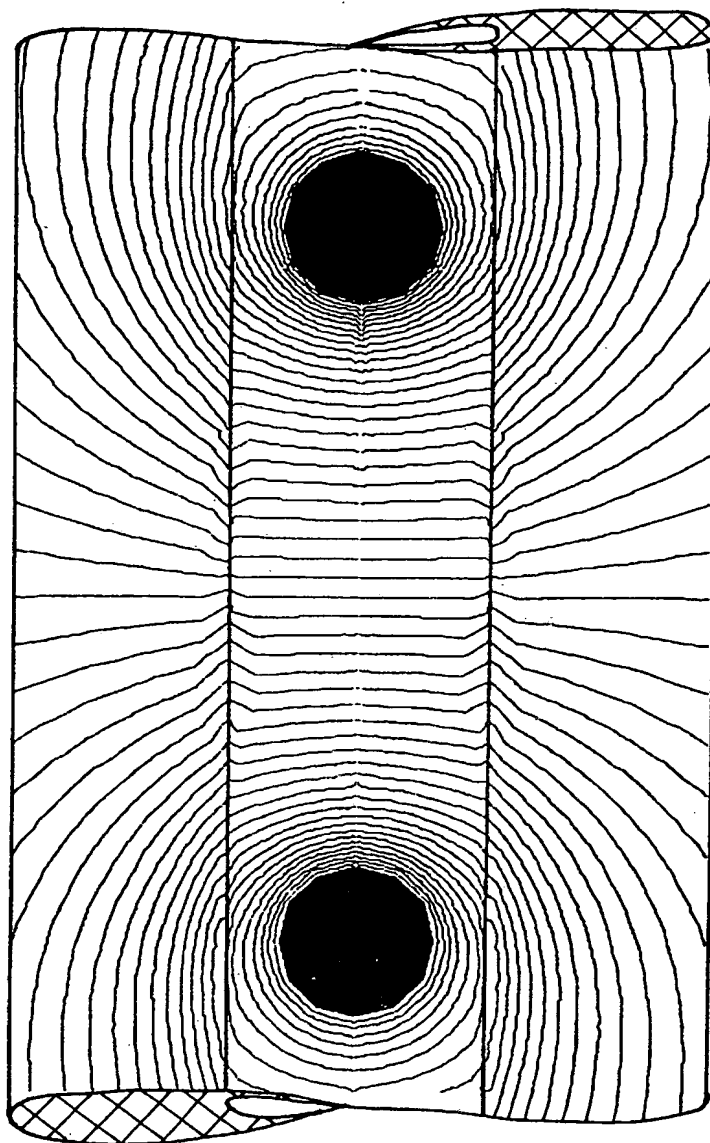


Fig. 7